

## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-259082

(43)Date of publication of application : 19.11.1991

(51)Int.Cl.

C12N 9/08

(21)Application number : 02-054239

(71)Applicant : KOKEN CO LTD

(22)Date of filing : 06.03.1990

(72)Inventor : ASO TAKESHI  
SAKOTA NAOICHI**(54) PRODUCTION OF RICE HULL PEROXIDASE AND RICE HULL PEROXIDASE PRODUCED BY THE SAME METHOD****(57)Abstract:**

**PURPOSE:** To obtain peroxidase from rice hulls in simple processes by crushing rice hulls in water, centrifuging to obtain a crude enzyme solution, performing an elaborate filtration to obtain a clear filtrated solution, concentrating, crystallizing and separating out the main portion of protein other than peroxidase, separating said enzyme and purifying.

**CONSTITUTION:** 1-10 times by weight, preferably 2-7 times by weight of water is added to rice hulls and the rice hulls are crushed in water using a crusher such as a microcutter. Thereafter, the resultant mixture is centrifuged to obtain a crude enzyme solution and the solution is clarified by an elaborated filtration using a membrane, then concentrated to about 1/10-1/100 by ultrafiltration. Next, said concentrated solution is treated by an organic solvent, preferably isopropanol and purified to obtain peroxidase. In said case, isopropanol is added so as the concentration of isopropanol to be 3-40% to precipitate the main portion of protein other than peroxidase. Then, isopropanol is further added to supernatant so as the concentration of isopropanol to be 60-80%, thus precipitated enzyme is separated out by centrifugation.

**LEGAL STATUS**

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

# EUROPEAN PATENT OFFICE

## Patent Abstracts of Japan

PUBLICATION NUMBER : 03259082

PUBLICATION DATE : 19-11-91

APPLICATION DATE : 06-03-90

APPLICATION NUMBER : 02054239

APPLICANT : KOKEN CO LTD;

INVENTOR : SAKOTA NAOICHI;

INT.CL. : C12N 9/08

TITLE : PRODUCTION OF RICE HULL PEROXIDASE AND RICE HULL PEROXIDASE  
PRODUCED BY THE SAME METHOD

ABSTRACT : PURPOSE: To obtain peroxidase from rice hulls in simple processes by crushing rice hulls in water, centrifuging to obtain a crude enzyme solution, performing an elaborate filtration to obtain a clear filtrated solution, concentrating, crystallizing and separating out the main portion of protein other than peroxidase, separating said enzyme and purifying.

CONSTITUTION: 1-10 times by weight, preferably 2-7 times by weight of water is added to rice hulls and the rice hulls are crushed in water using a crusher such as a microcutter. Thereafter, the resultant mixture is centrifuged to obtain a crude enzyme solution and the solution is clarified by an elaborated filtration using a membrane, then concentrated to about 1/10-1/100 by ultrafiltration. Next, said concentrated solution is treated by an organic solvent, preferably isopropanol and purified to obtain peroxidase. In said case, isopropanol is added so as the concentration of isopropanol to be 3-40% to precipitate the main portion of protein other than peroxidase. Then, isopropanol is further added to supernatant so as the concentration of isopropanol to be 60-80%, thus precipitated enzyme is separated out by centrifugation.

COPYRIGHT: (C)1991,JPO&Japio

⑨ 日本国特許庁(JP)

⑩ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A) 平3-259082

⑤ Int. Cl.<sup>3</sup>  
C 12 N 9/08

識別記号 庁内整理番号  
7823-4B

⑬ 公開 平成3年(1991)11月19日

審査請求 未請求 請求項の数 2 (全5頁)

⑭ 発明の名称 イネモミガラパーオキシダーゼの製造方法及びその方法で製造されたイネモミガラパーオキシダーゼ

⑯ 特 願 平2-54239

⑰ 出 願 平2(1990)3月6日

⑱ 発 明 者 阿 蘇 雄 山形県鶴岡市山王町12-46  
⑱ 発 明 者 迫 田 直 一 兵庫県神戸市東灘区住吉本町1丁目23番24号  
⑲ 出 願 人 株 式 会 社 高 研 東京都新宿区下落合3丁目5-18  
⑳ 代 理 人 弁 理 士 尾 関 弘

明 細 書

1. 発明の名称

イネモミガラパーオキシダーゼの製造方法  
及びその方法で製造されたイネモミガラ  
パーオキシダーゼ

2. 特許請求の範囲

- (1) イネモミガラ1重量部に対し、1～10倍重量部の水を添加し水中で破碎した後、遠心分離によって粗酵素液を分離し、得られた粗酵素液を膜を利用した精密濾過によって清澄溶液となし、次いで、限外濾過によって濃縮した後、有機溶剤を用いてパーオキシダーゼ以外の大部分の蛋白質を析出させ、分離した後、該酵素を分離、精製することからなるパーオキシダーゼの製造方法。
- (2) 請求項(1)に記載の製造法により得られるパーオキシダーゼ。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明はイネモミガラより簡単な操作によって

純化パーオキシダーゼを製造する方法及び該方法により得られるパーオキシダーゼに関する。

(従来の技術)

パーオキシダーゼは、過酸化物質たとえば過酸化水素の存在下で、種々の供与体の酸化反応を触媒する酵素で、動物あるいは植物に由来する各種のパーオキシダーゼ及び微生物産生のパーオキシダーゼ等が知られている。その中で特に西洋ワサビのパーオキシダーゼは古くから研究が成されている。パーオキシダーゼは、過酸化水素を生成する酸化酵素と組み合わせて糖類、アミノ酸、有機塩基、コレステロール、ポリアミン等の微量定量に利用されているほか、抗原あるいは抗体の標識用酵素等、広範囲の分野にわたって利用されている。

このような広範囲にわたって利用できるパーオキシダーゼがイネモミガラ中に存在することは、1970年、安江らによって指摘されている(Rep. Takai Br. Crop Sci. Soc. Japan、第59巻、第6頁)。イネモミガラからパーオキシダーゼを抽出する方法としては、イネモミガラを0.01～0.1モ

ル濃度の緩衝液、たとえばリン酸緩衝液中で微粉化する方法が用いられている。しかしイネモミガラは多量のシリカを含有し、堅固な構造を有するため、これを微粉化することは機械的にも多大な困難を伴うばかりでなく、エネルギー的にも経済的な製造法とは言い難い。

更にリン酸緩衝液等の緩衝液を使用して抽出した粗酵素液には多量の異種蛋白質が可溶化してくるため、有機溶剤分画、硫酸分画、透析、多種のカラム処理等の複雑な処理工程を反復して行わなければならない、その操作が極めて煩雑であり、且つ得られる酵素の収量も決して望ましいものではなかった。

またモミガラパーオキシダーゼの製造方法（特願昭 63-222516 号）では、モミガラより抽出した粗酵素液を限外濾過装置により直接濃縮を行うが、この方法では限外濾過膜が目詰まりを起し易く、濃縮を行う効率が低下し易い。また膜の目詰まりを解消するために酸やアルカリ溶液を用いて頻りに再生する必要がある、このために

することからなるパーオキシダーゼ製造法である。

#### 〔発明の作用並びに構成〕

本発明に於いて使用される水とは、蒸留水、イオン交換水はもとより、いかなる水であってもよく、たとえば水道水、工業用水であってもよい。

そして、その水の使用量はイネモミガラ 1 重量部に対し 1～10 倍重量部、好ましくは 2～7 倍重量部である。

この点について、イネモミガラの水中での破碎によるパーオキシダーゼの抽出量を調べたところ第 1 図のような結果が得られた。即ち第 1 図はモミガラに対する抽出水量（重量倍）と抽出された酵素の収率（％）と比活性との関係を示した図である。図中（イ）は比活性を、（ロ）は酵素収量を示す。この図より水量が 1～2 倍量では、遠心分離によって得られる粗酵素液量が使用水量に対して比較的少量になるため酵素収率が少ない。ただ実際には遠心分離後更に水洗いを行うことで酵素収率は向上させることができるが、破碎機内での発熱を考えると抽出水量としては、モミガラの

膜の劣化が激しく、経済的に難点があった。

#### 〔発明が解決しようとする課題〕

このような欠点を解決し、イネモミガラより簡単な操作でパーオキシダーゼを安価に製造する方法を種々検討した結果、0.01～0.1 モル濃度のリン酸緩衝液の代わりに水を使用し、水中で破碎して抽出実験を行ったところ、極めて容易にパーオキシダーゼを抽出でき、更に膜を利用した精密濾過を行うことによって連続的に効率よく製造できる方法を見出し、本発明を完成するに至った。本発明の目的は、イネモミガラより簡単な操作によりパーオキシダーゼを抽出する方法を提供するにある。

#### 〔課題を解決するための手段〕

本発明はイネモミガラ 1 重量部に対し、1～10 倍重量部の水を添加し、イネモミガラを水中で破碎する。その後遠心分離によって粗酵素液を分離し、膜を利用した精密濾過によって濾別し清澄な粗酵素液となし、得られた粗酵素液を限外濾過によって濃縮した後、有機溶剤を用いて分離、精製

2 倍程度がその下限と考えられる。また抽出水量を多量に増加させることは異種蛋白質の抽出を促進することになり、抽出されたパーオキシダーゼの比活性（U/mg 蛋白質）を低下させることになる。これらのことから水の使用量はイネモミガラ 1 重量部に対し 1～10 倍重量部、好ましくは 2～7 倍重量部が適当である。

次に本発明に於ける第一の特徴は、モミガラを破碎することである。即ち破碎とは、必ずしも微細な粒子まで粉碎することではなく、モミガラの外皮との内層の蛋白質層とを適当なズリ応力を加えて剥離させる程度に粉碎することである。

外皮を剥離させることによって水易溶性のパーオキシダーゼは、他の蛋白質に先駆けて容易に水によって抽出される。使用する破碎機としては、特に限定はないが、マイクロカッター（ステファン社製）、マスコロイダー（増幸産業製）などが好ましい。尚、破碎回数についてはモミガラに対し 3 倍重量の水を用いマイクロカッターでの破碎を反復したところ、3 回の破碎で含有している全活性

の90%が抽出されることが判った。工業的抽出にあってはモミガラを1回破碎した後遠心分離によって粗酵素液を回収し、更にモミガラ破碎物を水洗することによって目的を達することができる。

しかしながらこのようにして得た粗酵素液には、非常に微細な不溶物が混在しており、限外濾過膜による濃縮工程に於いて限外濾過膜の目詰まりが生じ易く、頻りに酸やアルカリ溶液によって再生洗浄を行わなければならない。そのために膜の劣化が激しく、膜の寿命が短くなるという困難を伴うことが判った。

そこで本発明の第二の特徴は得られた粗酵素液を膜を利用した精密濾過によって清澄な粗酵素液となすことである。

即ち精密濾過とは、0.1～数 $\mu$ m位の範囲の各種細菌を含む微粒子をほぼ100%近くまで完全に分離除去するための特殊な濾過方法で、本発明に於いて使用するものは、特に膜を利用するものである。

膜を利用した精密濾過には、メンブランフィル

ター法とホローファイバー法とがある。前者は、メンブランフィルターと言われる膜をホルダーにセットし、濾過原液を循環させながら濾過を行う方法である。一方後者は中空系と言われる細い筒状の膜を数百本から数千本を束にした膜を使用する方法である。

これらの精密濾過法は一般にクロスフロー型(十字流型)と言われるタイプの精密濾過方法で、濾過原液を循環させながら濾過を行うため、目詰まりが起こりにくく連続的に濾過できる利点がある。

本発明に用いる精密濾過法としては何れの方法でも良く、たとえばマイクロザ(旭化成社製、ホローファイバー法)、フィルトロン(富士フィルター工業社製、メンブランフィルター法)等の装置が用いられる。

このような方法によって得られた粗酵素液は、非常に微細な不溶物をほとんど含んでいない極めて清澄な液であるため、容易に限外濾過によって濃縮され、且つ目詰まりを起こしにくい。

次に本酵素液は限外濾過によって約1/10～1/100まで濃縮される。ここで得られた濃縮粗酵素液の比活性(U/mg蛋白質)は従来の多量のリン酸緩衝液を用いた抽出液に比較して2.5～25倍の比活性を有するに至るが、なお少量の異種蛋白質を含有しているので、該酵素の工業的使用に対して、なお精製を必要とする場合もある。

次に本発明の第三の特徴は有機溶剤を使用して粗酵素液よりパーオキシダーゼ以外の異種蛋白質を分離、除去することである。

本発明に於いて使用される有機溶剤は通常溶剤として使用されている有機溶剤であればよく、たとえばメタノール、エタノール、アセトン、イソプロパノール等があるが、特にイソプロパノールが好ましい。

従来のパーオキシダーゼの精製法の基本は粗酵素溶液のアセトン分画、硫酸分画操作であるが、前者は夏期に於ける操作の危険性から、また後者は大量の硫酸を用いるため、透析を必要とすることからいずれも工業的精製法としては適当でない

と思われる。

本発明者らは、イネモミガラパーオキシダーゼがイソプロパノールに対して極めて安定であり、室温であれば70%イソプロパノール水溶液中に数日間放置してもほとんど活性を失わないことから、イソプロパノールを異種蛋白質の分離に使用することを試みた。その結果、イソプロパノール濃度30～40%がパーオキシダーゼと異種蛋白質を分離するのに適した濃度であることを見出した。

次にイソプロパノールを使用したパーオキシダーゼの抽出、分離方法について述べる。即ちイネモミガラを水中で破碎し、遠心分離によって得られた粗酵素液を膜を用いた精密濾過によって清澄な粗酵素液となし、続いて限外濾過によって濃縮した液に、イソプロパノールの濃度が30～40%になるようにイソプロパノールを加え、パーオキシダーゼ以外の大部分の蛋白質を沈殿させ、遠心分離によってこれを除いた上澄みに更にイソプロパノールの濃度が60～80%になるようにイソプロパノールを加え、沈殿した酵素を遠心分離によって

分取する。この際、分離温度としては、常温付近以下であれば良く、特に冷却する必要はない。

次にイソプロパノールの濃度と蛋白質収量及び該濃度での沈澱物中のパーオキシダーゼ相対活性との関係を第2図に示す。但し第2図中(イ)は蛋白質収量を、(ロ)は相対活性を示す。この図に見られるように、該酵素はイソプロパノール30~40%濃度までの沈澱物中にはほとんど含まれないのに対し、異種蛋白質はその約50%がこの濃度までに沈澱することを見出した。従って30~40%イソプロパノール濃度までに沈澱する蛋白質を濾別または遠心分離によって除去した後、イソプロパノール濃度を60~80%に高めて得た沈澱物中に存在する酵素は、イソプロパノール処理を施す前の粗酵素液に対して約2.5倍の比活性を有することとなり、冷蔵によって極めて長期の保存に耐えることから、そのままでも工業的使用に供することのできるパーオキシダーゼが得られたことになる。この酵素沈澱は、更に精製、乾燥することによって純化酵素粉末として使用することも可能で

て約25ℓに濃縮した。これにイソプロパノールを攪拌しながら約17ℓ加えて10分間放置した。この時のイソプロパノールの濃度は約40%となる。

次にこの粗酵素-イソプロパノール混液を高速連続遠心分離機(15,000 r.p.m.)により不溶残渣を除去し、得られた上澄みに対し更にイソプロパノールを攪拌しながら約42ℓ加えて70%イソプロパノール濃度とし、10分間放置した。

粗酵素-イソプロパノール混液から高速連続遠心分離機(15,000 r.p.m.)により沈澱を分取した。この沈澱を純水に溶解し、凍結乾燥してパーオキシダーゼ標品とした。

#### 実施例 2

実施例 1と同様の方法でイソプロパノール40%濃度で不溶残渣を除去した粗酵素-イソプロパノール混液に更にイソプロパノールを攪拌しながら約42ℓ加えて70%イソプロパノール濃度とし、10分間放置した。粗酵素-イソプロパノール混液から高速連続遠心分離機(15,000 r.p.m.)により沈澱を分取した。この沈澱を沈澱重量の10倍重量部

ある。

#### 〔実施例〕

以下、実施例によって酵素の製造方法を説明するが、本発明はその要旨を逸脱しない限り以下の実施例に何等限定されるものではない。

#### 実施例 1

モミガラ150 kgに対して、400 ℓの水道水を加え、マスコロイダーによって破砕した後、デコーン型連続遠心脱水機によりモミガラと抽出液を分離して約350 ℓの粗酵素液を得た。この粗酵素液を高速連続遠心機(シャープレス、1500 r.p.m.)により比較的粒径の大きい不溶残渣を除去し、ホロファイバー型精密濾過装置(旭化成社製 PSH-303、公称孔径 0.1 μm)により清澄粗酵素液約270 ℓを得た。

この操作に於いて1回の精密濾過により約60~80%の酵素が通過し、濃縮された残渣に更に加水することにより90%以上の収量があった。この清澄粗酵素液をホロファイバー型限外濾過装置(旭化成社製 ACP-3053、分画分子量 13,000)を用い

の50 mMリン酸緩衝液に溶解し、同緩衝液で平衡化したDEAEセルロース 500 gと混合した後、バケット型遠心機により通過画分1を得た。遠心機内に残ったDEAEセルロースケーキは、沈澱重量の10倍重量部の上記緩衝液と混合し、再度バケット型遠心機により通過画分2を得た。

この操作で該酵素は吸着されずに通過するが、不純蛋白質は吸着される。ここで得られた通過画分1と通過画分2を混合し、ホロファイバー型限外濾過装置にて脱塩、濃縮した後凍結乾燥してパーオキシダーゼ標品とした。

#### 実施例 3

実施例 2と同様の方法で得られた通過画分1と通過画分2を混合し、ホロファイバー型限外濾過装置にて脱塩、濃縮した酵素溶液約1 ℓに8.77 gの塩化ナトリウムと50 mlの1 M リン酸緩衝液を加えた。この酵素溶液にコンカナバリン A-セルロフィン(チッソ社製)を加え約1時間攪拌して、パーオキシダーゼを吸着させた後、カラム(内径 11.3 cm×高さ 10 cm)に充填し、0.15 M

塩化ナトリウムを含む0.05M リン酸緩衝液約3ℓで洗浄した。次に、0.15M メチル化グルコースと0.15M 塩化ナトリウムを含む0.05M リン酸緩衝液約3ℓでパーオキシダーゼを溶出させた後、ホロファイバー型限外濾過装置にて脱塩、濃縮後、凍結乾燥してパーオキシダーゼ標品とした。

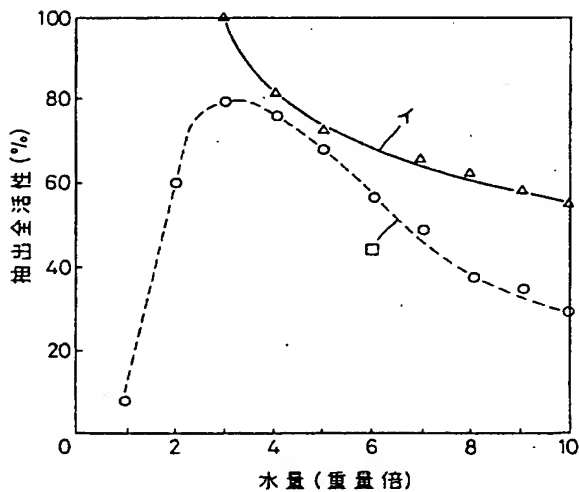
これらのパーオキシダーゼ標品の収量、並びに粗酵素液に対する活性収率、精製倍率及びRZ値を第1表に示した。

第 1 表

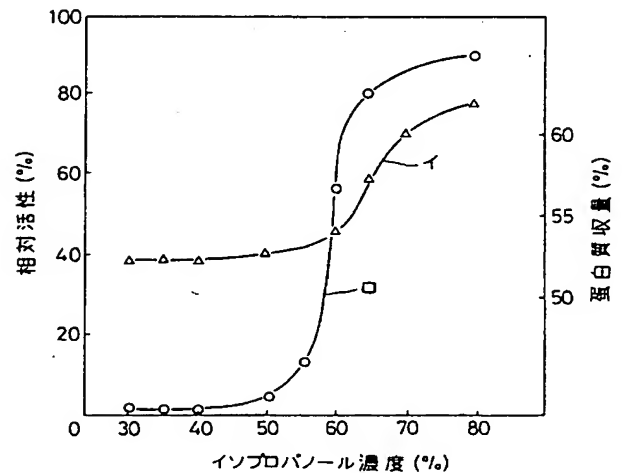
パーオキシダーゼ標品	精製倍率 (倍) *1	活性収量 (%) *2	酵素収量 (g) *3	RZ値 *4
実施例 1	7.53	33.2	5.93	0.11
実施例 2	13.32	25.1	2.53	0.35
実施例 3	69.00	20.3	0.40	1.7

- \* 1 精製倍率 =  $\frac{\text{精製酵素の比活性}}{\text{粗酵素液の比活性}}$
- \* 2 収 率 =  $\frac{\text{精製酵素の全活性}}{\text{粗酵素液の全活性}} \times 100$
- \* 3 酵素収量は、凍結乾燥標品の重量で示した。

第 1 図



第 2 図



$$* 4 \quad RZ \text{ 値} = \frac{405 \text{ nm に於ける吸光度}}{280 \text{ nm に於ける吸光度}}$$

## 〔効 果〕

以上述べたように本発明は、イネモミガラより水を使用してパーオキシダーゼを抽出し、得られた粗酵素液から膜を利用した精密濾過を行うことによって連続的に効率良く抽出でき、特にイソプロパノールを用いた場合イソプロパノール濃度を30～80%の範囲で酵素蛋白質を分画沈殿するという極めて簡単な操作を基本とする製造方法で従来の製造方法に比べ、遥かに安価にパーオキシダーゼを得ることができる。

## 4. 図面の簡単な説明

第1図は、モミガラに対する抽出水量(重量倍)と抽出された酵素の収率(%)と比活性との関係を示した図、第2図はイソプロパノールの濃度とその濃度で沈殿する蛋白質収量及び、沈殿物中に存在するパーオキシダーゼの相対活性との関係を示した図である。